

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A) 平2-138978

⑫ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)5月28日

C 12 N 15/48

ZNA

8515-4B

7/04

C

8214-4B

C 12 P 21/02

審査請求 未請求 請求項の数 18 (全 15 頁)

⑭ 発明の名称 新型蛋白質、該遺伝子を含有する配列、ベクター、製造方法及び用途

⑮ 特 願 平1-120229

⑯ 出 願 平1(1989)5月12日

優先権主張 ⑰ 1988年5月12日 ⑱ 米国(US) ⑲ 193321

⑳ 発 明 者 ウィリアム・アラン・アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02140、ケンブリッジ、マウント・バーナン・ストリート・24

㉑ 出 願 人 デイナ・フアーバー・アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02115、ボストン、キャンサー・インスティテュート、ビニイ・ストリート・44

㉒ 代 理 人 弁護士 川口 義雄 外2名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

新型蛋白質、該遺伝子を含有する配列、ベクター、製造方法及び用途

2. 特許請求の範囲

(1) (a) ウイルス蛋白質を発現すべく AUG コドンがすぐ上流に適切な読み枠で挿入されている HIV-1 ゲノムの 5541~8017 領域のヌクレオチドに对应する十分な数のヌクレオチドを含有する DNA 断片であって、全 HIV-1 ゲノムを含有しないもの；及び

(b) 該 DNA 断片の上流にあるプロモータを含有するベクター。

(2) VPU 遺伝子を含有するが、全 HIV-1 ゲノムを含まない DNA 断片。

(3) 十分な数のヌクレオチドが HIV-1 の [1] 株の U 樹状読み枠に对应する特許請求の範

囲第 1 項に記載のベクター。

(4) (a) 特許請求の範囲第 2 項記載の DNA 断片、及び

(b) 該 DNA 断片上流のプロモータを含有するベクター。

(5) プロモータがウイルスプロモータであって、ベクターがまたエンハンサー及びポリアダニル化配列を含む特許請求の範囲第 4 項記載のベクター。

(6) VPU 遺伝子により産生される實質的に純粋な蛋白質。

(7) 特許請求の範囲第 2 項記載の DNA 断片の VPU 遺伝子により産生される蛋白質。

(8) 蛋白質の分子量が約 18 kD である特許請求の範囲第 7 項記載の蛋白質。

(9) 蛋白質の分子量が約 15 kD である特許請求の範囲第 7 項記載の蛋白質。

(10) 調整して 15 kD 蛋白質を形成する特許請求の

特開平 2-138978(2)

範囲第8項記載の蛋白質。

00 特許請求の範囲第7項記載の蛋白質の抗原決定基と免疫学的に交叉反応する抗原決定基を有するポリペプチド。

01 V_PU遺伝子産物の73~81番目アミノ酸と免疫学的に交叉反応する特許請求の範囲第11項記載のポリペプチド。

02 ウイルス蛋白質Iに対して生じる抗体の存在の検定方法であって、

(a) 所定の標本を採取し、

(b) 特許請求の範囲第11項のポリペプチドを該標本に添加して、

(c) 該ポリペプチドにより複合体が形成されたかを測定することより成る方法。

03 ウイルス蛋白質Iの存在に関する検定方法であって、

(a) 所定の標本を採取し、

- 3 -

製の方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は新型精製ポリペプチド、このポリペプチドの製造方法、この蛋白質に対する抗体、上記ポリペプチド中に存在する抗原決定基に対する抗体の存在を生物標本で検出するための検定、及びウイルス複製に及ぼすこの蛋白質のマイナス効果に対する検定に関する。

ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1、HTLV-Ⅱ、LAV又はHTLV-Ⅲ/LAVとも呼ばれる)は慢性的免疫不全症候群(AIDS)及び関連疾患の原因である【Barre-Sinoussi 等、Science 220: 800~811(1983)；Gallo等、Science 224: 500~503(1984)；Lano 等、Science 225: 840~842(1984)；Popovic等、Science 224: 497~500(1984)；Sarnagadharan 等、Science 224: 508~508

(b) 抗体を特許請求の範囲第7項記載の蛋白質に添加して、

(c) 該抗体により複合体が形成されたかを測定することより成る方法。

04 十分量の特許請求の範囲第7項記載の蛋白質を該蛋白質を複製的に発現しないHIV-1株感染ウイルス細胞に投与することより成るHIVウイルス複製の弱体化方法。

05 さらに、特許請求の範囲第7項記載の蛋白質の弱体化作用と類似の作用を示す化合物を前記ウイルス細胞に十分量添加することより成る特許請求の範囲第15項記載の方法。

06 さらに、特許請求の範囲第7項記載の蛋白質の弱体化作用を増強する化合物を前記ウイルス細胞に十分量添加することより成る特許請求の範囲第15又は16項記載の方法。

07 増強が相乗的である特許請求の範囲第17項記

- 4 -

(1984)；Singal 等、N. Engl. J. Med. 305: 1439~1444(1981)】。疫学観察期間とその後の免疫系及び中枢神経系の進行性脱失が本疾患の特徴である。本ウイルスの研究から、複製は密度に調節されており、且つTリンパ球のCD4陽性ヘルパーサブセットの持続感染と潜伏感染とが組織培養中で起ることが示されている【Zagury 等、Science 231: 850~853(1988)】。感染患者におけるウイルス発現もまた、感染ウイルスの力価が本疾患経過を通じてずっと低い場合は調節されるものと思われる。HIV-1の複製及びゲノム構成の分子的研究からは、それが少なくとも8個の遺伝子をコードすることが示されている【Ratner 等、Nature 313: 277~284(1985)；Sanchez-Pescador 等、Science 227: 484~492(1985)；Muesling 等、Nature 313: 450~457(1985)；Wain-

- 5 -

-558-

- 6 -

特開平 2-138978(3)

Hobson 等, Cell 40: 9~17 (1985)]。3 種類の遺伝子、すなわち gag 遺伝子、pol 遺伝子及び env 遺伝子はすべてのレトロウイルスに共通している。しかしながら、そのゲノムはまた、大半のレトロウイルスに共通して認められるわけではない別の 3 つの遺伝子、すなわち src 遺伝子、tax 遺伝子、trk 遺伝子及び R 遺伝子をもコード化する。

[Sodroski 等, Science 231: 1549~1553 (1986) ; Araya 等, Science 229: 69~73 (1985) ; Sodroski 等, Science 227: 171~173 (1985) ; Sodroski 等, Nature 321: 412~417 (1986) ; Feinberg 等, Cell 48: 807~817 (1986) ; Wono-Staal 等, AIDS, Res. and Human Retroviruses 3: 33~39 (1987) ; これらはすべて参照により本明細書中に含めるものとする。]

- 7 -

表面に吸着し月つるなる HIV 株で高度に保存される別の蛋白質がある場合にそれは有用であると思われる。

ウイルス複製にマイナス効果（負の作用）を示す HIV 病原体はどれも、治療に用いる可能性を評価する必要がある。特に、負の作用を増強又は顕微する作用としての薬剤の有用性を評価するために、この負の作用を検定することが必要である。

発明の要約

HIV-1 感染細胞により発現される蛋白質をわれわれは発見した。その蛋白質は分子量が約 16 kD であるが、しかし 15 kD 型に断片化する。この蛋白質は抗原決定基を有し、AIDS 感染患者から得た患者血清はこの蛋白質の両型を認識するが一方、正常患者の血清はそれを認識しない。

この蛋白質は培養ヒト CD4⁺リンパ球における HIV-1 ウイルス複製に負の作用を及ぼすと

その他のレトロウイルス、すなわち HIV-2 及び Simian 免疫不全ウイルス (SIV) (従来 STLV-II と呼んでいた) のウイルスゲノム由来のヌクレオチド配列もまた tax 調節配列及び src 調節配列を含み、構造遺伝子の含有に加え、トランスアクチベーションを示す [Guyader 等, Nature 326: 662~669 (1987) ; Chakrabarti 等, Nature 328: 543~547 (1987)]。HIV-1 と、HIV-2 のような他のレトロウイルスとを容易に区別できる方法がめれば役に立つと思われる。

AIDS ウイルスに対するワクチンの開発に付随する問題の 1 つは、HIV の種々の株が高度に保存されているわけではないことである。また、細胞表面に吸着するためにターゲットとして用いられている エンベロープ には低限で多大の変異性が認められる。したがって、種別

- 8 -

考えられる。

発明の説明

HIV-1 が付加的蛋白質をコードし、またこの蛋白質に対する抗体が HIV-1 感染者の血清中に検出されることが判明した。さらに、HIV-1 単離物と他のヒト及びサル免疫不全ウイルスとを区別するためにこの蛋白質を用いることができる [Guyader, M. 等, Nature 326: 上記 (1987) ; Hirsch, V. 等, Cell 49: 307~319 (1987) ; Chakrabarti, I. 等, Nature 328: 上記]。それは慢性的ウイルスが同様の蛋白質をコードしないことも判明しているからである。

この蛋白質は、HIV-1 ゲノムのヌクレオチド 5541~8017 に対応する十分な数のヌクレオチドを含む DNA 断片により発現されるが、この場合 AUG コドンがこの領域のすぐ上流に適切な読み

- 10 -

- 9 -

-559-

特開平 2-138978(4)

枠で挿入されておりポリペプチドを発現することができる。この領域は典型的にはリボ核酸読み枠(open reading frame)に対応するHIV-1の gag 遺伝子及び env 遺伝子の第一コード化エキソンと外膜(エンベロープ)糖蛋白質遺伝子との間の領域からのこのリボ核酸読み枠の模式図を図1Aに示す。しかしながら、多数の株は適当な読み枠中にAUGコドンを含めない。HIV-1のEII株にはこのような配列が含まれている。図1Aは、SIV(20,21)及びHIV-2(ROD単離物, 19)と比較した場合のHIV-1(EII単離物, 24)の中心領域の遺伝子的構成を示している。矢印はウイルス遺伝子におけるイニシエータAUGコドンを示している。多数のHIV-1株は、アミノ酸長が約80~82であってAUGコドンにより開始された場合にこの領域から合成されるこの蛋白質をコード化する能力がある。

- 11 -

を含有する(図1C)が、これは膜輸送配列と似ている。

このことは、細胞膜を通して糖蛋白質が輸送されることを示唆する。さらに、ウイルスゲノム内のリボ核酸読み枠の位置は、該蛋白質が外膜糖蛋白質に関する変異内リーダー配列を形成することを示唆する。位置Xでのリボ核酸読み枠のスライディングイベント及び翻訳時のフレームシフトの発生により、外膜糖蛋白質との融合蛋白質が生じる。このような融合は、リボ核酸読み枠は外膜糖蛋白質のアミノ末端に付着して新しいアミノ末端を形成するようになる。

分子量が約15キロダルトン(kD)の蛋白質を調製して、分子量が約15kDの別の蛋白質を作ることができる。

この蛋白質に関する遺伝子はIと呼ばれる。開放読み枠中に存在するため(Wain-Hobson,

図1Bは様々な株間のこの蛋白質配列を並列して示したものである。EII株を参照のために挙げる。標準的方法を用いて空白()を挿入し、比較し易くした。図印は同一アミノ酸を示す。比較したHIV単離物としては、EII, M01 [Alizon, M., 等, Cell 40: 63~74 (1986)], HXBc2, BH-10, BH8, pIIXB3 [Ratner, L., 等, Nature 313: 277~283(1985)], BRU [Wain-Hobson, S 等, Cell 40: 9~17 (1985)] 及びUS12 [Sanchez-Pescador, R 等, Science 227: 484~492(1985)] が挙げられる。

これらの株を一般的に入乎できる。US12は39番目に終止コドンを含めるが、しかしながら、同一フレームシフトは、EII参照配列に比してよく保存されるアミノ酸43だけ大きい蛋白質を生じる。この新しい蛋白質は親水性リーダー配列

- 12 -

S 等, Cell 40: 9~17 (1985)]、ウイルス糖蛋白質U及びウイルス蛋白質Uに関する遺伝子 VPU と呼ぶよう提案する。

この蛋白質の特性をさらに詳しく調べるために、アミノ酸配列類似物を基として蛋白質の疎水性領域に対する配列に対応させて2つのオリゴペプチドを作った。ペプチド1と呼ばれる第1のオリゴペプチドはアミノ酸28~41に対応しており、一方ペプチド2と呼ばれる第2のオリゴペプチドは、アミノ酸73~81に対応した(図1B, 1C)。標準的方法を用いてこれらのペプチドをkeyhole limpet hemocyaninに結合し、これを用いて、例えば第3番目のウサギに抗体を産生した。抗血清を例示か注射した後、ウサギは免疫に用いたオリゴペプチドを認識する抗体を産生した。

図2は VPU 遺伝子産物の *in vitro* 特性を示す。15kDウイルス蛋白質と18kDウイルス蛋白質は

- 14 -

- 13 -

-560-

特開平 2-138978(5)

ともに、ペプチド2に対するウサギ抗血清によって沈降する(図2A, レーン4参照)。ペプチド1に対する抗血清もこれらの蛋白質を沈降させるが、しかしその程度は弱い。これに対して、これらの蛋白質は免疫原ウサギ血清から得た血清では沈降しなかった(図2A, レーン3)。図2BのデータはHIV血清陽性患者抗血清も15KD蛋白質と10KD蛋白質とを認識することを立証している(レーン2)。2つの蛋白質を沈降する患者抗血清のこの能力は一部はペプチド2で融合される(レーン3参照)。切断外膜融合物を免疫沈降するHIV-1感染患者の19種の血清のすべてがまた、15KD蛋白質と10KD蛋白質とを沈降することが判明した。正常患者抗血清はこれらの蛋白質を認識しなかった(レーン1)。

これらの蛋白質はHIV-1プロウイルス株の膜で高度に保存されると考えられる。事実、単離

- 15 -

[Terwilliger, E. 等, J. Virol, 60: 754~760(1986)]。VPUを発現できないプロウイルスは、例えばプロウイルスHXBc2によるトランスフェクションで産生され、培養内のT細胞中で成育するウイルスの能力によって実証される通り、複製可能であるが、しかしこれはVPU欠失ウイルスである。しかしながら、これは、VPU産物がウイルス複製又は発生の調節に必要な役割を演じる可能性を除外するものではない。

実際、p15^{VPU}及びp10^{VPU}に類似の蛋白質に関するコンピュータの助けを借りた研究により、HIV-2及びSIVが同様の蛋白質をコード化しないことが判明した。U₁組み枠に匹敵する開放読み枠を含有する株はなかった。HIV-2株とSIV株はともに、HIV-1単離物の場合に欠けている開放読み枠、すなわちX開放読み枠を含

- 17 -

した全HIV-1プロウイルス株にVPUに相当する領域に開放読み枠が含まれる。しかしながら、in vitroで誘発した多数の個々のプロウイルス株は、VPU発現を防止する単一点突然変位のためにこの領域から蛋白質を産生できないと考えられる。実際、同一ウイルス単離物から単離された異なるプロウイルス株はVPUをコード化する能力に関してはヘテロである。例えば、IIIB単離物の個々のプロウイルス株HXBc2, BHI0, BH-8及びBH-3はこれに関しては異なっている(図1B参照)。個々の独立したプロウイルスクローンが他のウイルス蛋白質、特に3'ORF産物をコード化する能力における同様の変異も注目されている。例えば、3'ORFに関するIIIBの単離物の場合、蛋白質産物を切断する突然変異により野生型より迅速に培養内で複製するウイルスが生じる。

- 18 -

有する[Guyader, M. 等, Nature 328, 上記(1987)]が、しかしVPU蛋白質とX開放読み枠から形成される可能性があるすべての蛋白質との間には検出可能な類似性は認められない。さらに、検査したHIV-2感染患者の血清はどれもVPUに対する抗体を含有しておらず、又、SIV感染サルRhesus macaquesにおいてもVPU産物に対する抗体は検出されなかった。

したがって、p15^{VPU}及びp10^{VPU}に対する抗血清を用いてHIV-1とSIV又はHIV-2との感染を区別できる。

さらに、VPU産物に対する患者抗体の測定を用いて感染を誘発するHIV-1の段階を測定することもできる。調節蛋白質をコードするのに用いるウイルス伝令RNAの研究により

[Messing, M. A. 等, Nature 313: 450~458(1985), Arya, S. K. 等, Science 229:

- 18 -

-561-

特開平 2-138978(6)

69-73(1985)、及び Sndroski, J. 等、
Nature 321: 413-417(1986)]、VPU がス
 プライシングによってこのようなウイルス
 mRNA から除外されることは明らかである。
 したがって、VPU は、完全にスプライシングさ
 れた mRNA のみが U 遺伝子不活化で発現
 するので、この産物不在下では作られないと考
 えられる [Sndroski, Nature 321, 上記;
 Folinberg, M. B. 等、Cell 46, 上記
 (1986)]。その結果、VPU 蛋白質は、他の
 リオン蛋白質のように、感染後期に合成される
 で、患者抗体を測定することによって感染の段階
 を測定することが可能である。

U 蛋白質の発現は、本明細書に述べた標準的
 方法を用いて、当業界の当業者により迅速に実施
 可能である。例えば、ヌクレオチド 5541-8017 由
 来の十分な数のヌクレオチドに対応するヌクレオ

- 19 -

チド配列を使用すべきである場合は、ヌクレオチ
 ド配列 5541 の直前に対応するヌクレオチドに、U
 開放読み枠のすぐ上流でこれに対して適当な読み
 枠内に AUG コドンを導入するか、又はこのよう
 な配列を生成するための点突然変異を作るかした
 なければならない。しかしながら、当業界で十分公
 知の標準的方法によりこれを行うことができる。

当業界で十分公知の方法を用いて、標準発現ベ
 クター、例えば SP6 プラスミドに VPU 遺伝子
 を挿入することにより (プラスミド pEV の作製
 を示す図 4 を参照されたい)、このプラスミドを
 用いて、標準技法により p15VPU 及び p16VPU を
 合成することができる。

この蛋白質を使用して抗原を調製し、ワクチン、
 例えば生弱毒性ワクチンを作ることができる。こ
 の蛋白質を用いて、蛋白質に対する抗原反応を起
 こすことができるし、また蛋白質がウイルス感染

- 21 -

チド配列である VPU 遺伝子を含む DNA 断片を
 作成できるが、この場合この領域のすぐ上流に
 この領域に対して適当な読み枠に AUG コドン
 を挿入し、U 蛋白質を発現する。典型的にはこの
 DNA 断片をその断片の上流にプロモータ好まし
 くはウイルスプロモータを含むベクターに挿
 入する。ベクターは好ましくはエンハンサ及びボ
 リアデニル化シグナルをも含む。HIV プロウイ
 ルスにおける U 開放読み枠に対応するスクレオチ
 ド配列を用いることが好ましいが、しかしながら、
 HXBc2 のような AUG 開始コドンを含まない
 株を用いる場合は、HIV 株 E11 で生じている
 ように、イニシエータ配列 AUG を適当な読み枠
 に付加することが保証されるよう注意しなければ
 ならない。よって、U 開放読み枠に対応する配列
 の使用が最も好ましい。

例えば HXBc2 株から得た U 開放読み枠に対

- 20 -

応する株を使用する場合には、ヌクレオチ
 ド配列 5541 の直前に対応するヌクレオチドに、U
 開放読み枠のすぐ上流でこれに対して適当な読み
 枠内に AUG コドンを導入するか、又はこのよう
 な配列を生成するための点突然変異を作るかした
 なければならない。しかしながら、当業界で十分公
 知の標準的方法によりこれを行うことができる。

上記の通り、それは病変に感染される抗原決定
 基を含むし、且つ HIV-1 感染細胞に特異的で
 あると思われるため、この蛋白質は、生物検体を
 検定してそれらが HIV-1 感染細胞を含有する
 か否かを測定する診断手段として特に有用である。
 標準技法を用いてこれらの検定を助成できる。例
 えば、所定の標本、すなわち検査すべき生物標本
 を採取し、抗イディオタイプ抗体又は免疫学的に
 p15VPU 及び p16VPU の抗原部位に類似のものを
 付加し得る。例えば、本明細書に記載の、アミノ
 酸 78-81 に対応するペプチド 2 (図 1B, 1C) は、
 このような抗原部位を反映している。好ましくは
 モノクローナル抗イディオタイプ抗体を使用する。

- 22 -

-562-

特開平 2-138978(7)

次いでこの標本をスクリーニングして反応が認められるか、すなわち複合体が抗体と抗原の間に形成されるか否かを測定する。そうする代わりに、公知の免疫検定方法、例えば固相免疫検定又は免疫沈降法（サンドイッチ）検定を用いて、ウイルス蛋白質とそれ自体の抗原決定基に対するモノクローナル又は多価抗体により検定可能である。

この蛋白質は培養中のHIV感染の伝染速度に阻害作用を及ぼすと考えられるため、それは、この現象を模倣又は増強するよう企図された薬剤又はその他の化合物のスクリーニング計画に関する候補を形成するものであるとも考えられる。例えば、その蛋白質を発現しないHIV-1株感染培養物に蛋白質を添加し、複製の阻害程度を測定し、次いで標準的技法によりこの阻害作用を増強する薬剤をスクリーニングすることができる。VPU遺伝子含有複製ベクターで細胞をトランス

- 23 -

Nuel, A. et al., Res. 12: 7035-7056 (1984)を用いて in vitroで合成したRNAを使用し、in vitro赤血球膜融合剤産物をプログラミングすることにより調べた [Pelham, H. P. B. 等, Emu, J. Biochem. 57: 247-256 (1986)]。 UAG遺伝子、UAA遺伝子及び一部の UAG遺伝子の最初のコード化エキソン4の領域に¹あるHIVプロウィルスのヌクレオチド長2231の制限断片からRNAを作製した。

実験用テンプレートはSP6バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモータ [Mellon, D. A. 等, 上掲] に対して 3' 側にあるHIV-1のE11株のプロウィルスの断片 [Alizon, M. 等, Cell 46, 上掲] より得た。例4は mRNA合成に用いるSP6プラスミドを示す。 UAG遺伝子、UAA遺伝子及び一部の UAG遺伝子の第一コード化エキソン4の領域に¹あるHIV

- 25 -

フェクトすることを含む当業界で十分公知のいずれかの技法により蛋白質を添加可能である。したがって、それら独自ではウィルス複製に対して臨床的に有効でない薬剤は、U蛋白質と併用すると阻害作用を増強するのに有効となる可能性がある。

以下の実施例により本発明をさらに詳しく説明する。これらの実施例は本発明を理解する際の助けとなるべく提示するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例

VPU遺伝子、すなわちAUG開始コドンを含むHIVゲノムの5541から8017までの十分数のヌクレオチドに対応する UAG遺伝子ヌクレオチド配列と UAA遺伝子ヌクレオチド配列の最初のコード化エキソン4の領域の蛋白質コード化能力を、Mellon 等の方法 (Mellon, D. A. 等,

- 24 -

E11プロウィルスから得たヌクレオチド長2231のBamHI~BglII断片は、SP6バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモータの 3' 側をクローン化したものであった。プラスミドを転写化するために用いる内部制限部位が示されている。この断片は、AUGコドンにより開始するこの領域に開放読み枠を有する (例1B) [Alizon, M. 等, Cell 46, 上掲]。例4に示す通り、このRNA転写に感して認められるウィルス配列は、UAG (BamHI部位) の第一コード化エキソンの 5' 末端から UAA 内の1838ヌクレオチド (BglII部位) にまで及んでいる。 UAG 遺伝子に関する開始コドンは、使用制限酵素すなわちBamHIがE11プロウィルス性を¹UAG開始コドンのTとGの間で開裂するので、このRNAにおいては無効ではない。

このプロウィルス断片由来のRNAを用いて

- 26 -

-563-

特開平 2-138978(8)

in vitro溶解系中で産生された蛋白質を³⁵S-メチオニンでラベルし、硫酸ドデシルナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を用いて大きさにより分離した。図2A参照のこと。HIV EII挿入物に対してポリリンカー 3' に位置するEGGR部位で消化してpEUPラスミドを塩酸化した。報告の通り[Polletier J. & Sonenberg, N., Cell 49: 515-526(1985)], SPGRNAポリメラーゼによるin vitro転写用のテンプレートとして用いたが、和し、CTP及びC&D類似体m⁷GpppGの濃度はそれぞれ0.2および1.0mMに上昇させた。報告の通り(27)、伝令RNAを[5-³H]CTPでラベルし、産製した。モデルのRNA(蜂眼の複製能)のin vitro翻訳を赤血球溶解産物中で実施した[Polhan, H. P. B. 等, J. Biochem. 87: 247-256

- 27 -

する3つの抗血清はすべて、ペプチド1に対する抗血清と同様に両蛋白質を認識する(レーン4)が、その強度はさらに弱い(データは示していない)。図2Aのデータもまた、ペプチド2が抗血清による15kD蛋白質と16kD蛋白質の両方に結合することを示す(レーン5)。しかしながら、ペプチド1(レーン6)又は無関係ペプチドは抗ペプチド2血清とは結合しない(レーン7)。

in vitro翻訳産物を分析するために他のプロウイルス断片由来のRNAを調製した。1期の実験において、RNA合成に使用するテンプレートを制限酵素関与により、予定のAUGコドン(RsaI部位)に対して5'側の7ヌクレオチドか又は予定のAUGのコドン(BbvI部位)に対して3'側の30ヌクレオチドを切断した(図4参照)。抗ペプチド2抗血清により認識される特定の蛋白質産物はこれらの実験では観察され

- 29 -

(1986)]。インキュベーションは、³⁵S-メチオニン存在下で、30℃で30分間行なった。15% SDS-PAGE(レーン2)により直接、あるいは免疫前ウサギ血清(レーン3)、抗ペプチド2血清(レーン4)、500 mMのペプチド2存在下での抗ペプチド2血清(レーン5)、ペプチド1(レーン6)、又は無関係なペプチドQEIAETATKTSSC(レーン7)で予め免疫沈降させて、標識化産物を分析した。レーン1は、mRNAを加えない全翻訳反応を表わす。この系で合成される蛋白質はレーン2に示されるウサギ抗ペプチド2血清により沈降される蛋白質も示めされている。分子重約15kD及び16kDの2つの蛋白質は非分離抽出物中で明らかであって、ウサギ抗血清により沈降される。15kD蛋白質と16kD蛋白質は、免疫前ウサギ血清からの血清によつては沈降しない(レーン3)。ペプチド2に対

- 28 -

なかった(図2b, レーン1及び2)。RNA合成に使用するテンプレートを予定の停止コドン(NdaI部位)に対して3'側の102ヌクレオチドで制限し、抗ペプチド2血清を用いて15kD蛋白質と16kD蛋白質を抽出した(図2B)(レーン3及び4)。以下の制限酵素、RsaI(レーン1)、BbvI(レーン2)及びNdaI(レーン3及び4)を用いてpEUPラスミドを塩酸化した。RNA²生成するSP6をin vitroで翻訳し、抗ペプチド2血清を用いて標識化産物に関して免疫沈降を実施した(レーン1,2及び4)。レーン3は全in vitro翻訳反応を表わす。

III B単位のHXBc2クローンの配列は、前記の通り、この領域由来のRNAが開放後、5'末端に開始コドンを欠けているため蛋白質を産生できないであろうことを示唆している。101塩基子、97塩基子及び一部の91塩基子

- 30 -

-564-

特開平 2-138978(9)

塩子の第一コード化エキソン間の領域
(BamHI部位:ヌクレオチド8017)にまたがり、E₁に存在するE₁I断片に対応する
HXBc2プロウイルスクローンの断片をIn
vitro転写してRNAを調製した。このRNAを
用いて、上記と同様の方法で赤血球溶解産物を企
画した。E₁IプロウイルスRNAの場合と同様、
E₁Iの開始コドンがRNAから欠失した。

15kD産物及び16kD産物に対応する蛋白質は
35S-メチオニン標識化抽出物又は抗ペプチド
2血清を用いて得られた沈降物中には認められ
なかった(図2C、レーン1,2)。SPBRNAポリ
メラーゼプロモータ[Melton, D. A. 等,
Nucleic Acid Res., 12: 7035-7056(1984)]
の3'側にあるHXBc2 DNAに1プロウィ
ルスDNAクローン[Dayton, A. I., Cell,
44: 941-947]から得られたS₁I(5441位

- 31 -

感染ヒト血清(レーン4):又はS₁V-感染サル
Rhesus macaque血清(レーン5)を用いて免疫沈
降した。その免疫沈降物を15%SDS-PAGE
上で分析した。15kD蛋白質及び16kD蛋白質を
認識する抗ペプチド2血清の感度を、本ウイルス
の3'側半分によりコード化されるHIV-1蛋
白質を本質的に発現する3つの細胞株で試験した。
[米国特許第 800,253号及び第 855,151号明細書
に記載の通りにこれらの細胞株を開発した。これ
は各図により本明細書中に含めるものとする]。
a₁I遺伝子と、しっかり融合されたHIVのプ
ロウイルスE₁I、HXBc2及びMal株
[Alizon, M. 等, Cell, 40, 上記]の

3'LTRとの間の領域を有するクローン化
HcL₀細胞株を調製し、次いで標準技法を用
いて単離した。これらの細胞株を単離するため
に用いた親細胞は、E₁Iコード化配列を認識

度)~BamHI(8017位置)切断断片を含むプ
ラスミド(pXU)を標準技法により^{作製}調製した。
EcoRIをpXUを直線化し、In vitro転写用
テンプレートとして用いた。

In vitro翻訳後、標準化産物を15%SDS-
PAGE(レーン1)上で直接的に、あるいは抗ペ
プチド2血清(レーン2)、又はHIV-1感染患
者血清(レーン3)で予の免疫沈降させて分析した。
しかしながら、HIV-1感染患者血清による免
疫沈降からは、切断外膜産物の存在は明確には示
されなかった(レーン3)。

図2Dは、この蛋白質とHIV-2及びS₁V
ウイルスとの交叉反応性を示す。pE₁ RNA
生成SP6のIn vitro翻訳後、標準化産物を正常
ヒト血清(レーン1); HIV-1感染ヒト血清
(レーン2); 500 nMのペプチド2存在下での
HIV-1感染患者血清(レーン3); HIV-2

- 32 -

するレトロウイルスベクターで感染後に、E₁I
遺伝産物の^大発現的発現のために予め選択された
[Reason, C. A. 等, J. Virol., 57: 379-
384 (1985)。各図により本明細書中に含めるもの
とする]。論文中に報告の通り[Lee, T. H.
等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:
7579-7583(1984)]、細胞を[³⁵S]メチオニン
及びシステインで標識し、細胞溶解物を免疫沈降
した。これらの細胞株は本質的にa₁I遺伝産物
とa₁V遺伝子産物とを産生する。これらの細胞
株の作製に用いたプラスミドは、a₁I遺伝子の
開始コドンの5'側に並列するHIV LTRを
含有した。E₁I遺伝子産物はtransに供給され
た。図3Aは、抗ペプチド2血清(レーン1)又は
HIV-1感染患者血清(レーン2)で免疫沈降し
たHcL₀ E₁I細胞株溶解産物を示す。図3
Bは免疫沈降ウサギ血清(レーン1); 抗ペプチド2

- 34 -

- 33 -

-565-

特開平 2-138978(10)

血清 (レーン3); 500 μ M のペプチド2 存在下での抗ペプチド2 血清 (レーン4); 正常ヒト血清 (レーン5); HIV-1 感染患者血清 (レーン6) により免疫沈降された HcLa tail EII 溶解産物を示す。レーン2 は、抗ペプチド2 血清による、pE U RNA から得られた標識化 in vitro 翻訳産物の免疫沈降を示す。図3Cは、免疫前ウサギ血清 (レーン1); 抗ペプチド2 血清 (レーン2); 正常ヒト血清 (レーン3) 及び HIV-1 感染患者血清 (レーン4) により免疫沈降した HcLa tail M₁I 溶解産物を示す。図3Dは、免疫前ウサギ血清 (レーン1); 抗ペプチド2 血清 (レーン2); 正常ヒト血清 (レーン3) 及び HIV-1 感染患者血清 (レーン4) により免疫沈降した HcLa tail I I I B 溶解産物を示す。図3のデータは、抗ペプチド2 抗血清が、in vitro で作られた 15kD 蛋白質と一緒に移

- 35 -

(+1 が転写開始部位) がそれに対するクローン B H 10 からの配列に置換される組み換えプロウイルスを制作した。

HXBc2 とは異なり、B H 10 は U 蛋白質に関する AUG 開始コドンを持つ。他の点では B H 10 は HXBc2 と非常によく似ている。この組換えが in vitro 翻訳産物の結果、in vitro tail 及び tail V 遺伝子産物における少数の保存アミノ酸変化以外は HXBc2 に非常によく似たプロウイルスクローンを生成することであり、U 開始読み枠を利用する能力を生成することであった。

HXBc2 及び組換え B H 10 クローンによる Jurkat 細胞のトランスフェクションの結果、ウイルス産生が起きたが、しかし細胞を通じてのウイルス由来 B H 10 の感染は HXBc2 由来ウイルスよりも有意に低かった。

各段階の部分標本は、³⁵S-システイン及び

- 37 -

働する EII プロウイルス由来の細胞株における 15kD (レーン3) を特異的に認識することを立証する。同じ抗血清が、MAL (図3C) プロウイルス又は HXBc2 (図3D) プロウイルス由来の蛋白質を発現する細胞株の蛋白質を認識しない。これは予期通りの結果であり、HXBc2 プロウイルス又は M₁I プロウイルスは真実に位相する開始コドンを含むしない (図2B) ためである。EII プロウイルス由来の細胞株における HIV-1 患者抗血清により 15kD 蛋白質が検出されないのは、明らかに、使用した患者抗血清における抗-VPU 決定が低かったことと、細胞株中の 15kD 蛋白質量が in vitro 翻訳産物に比して非常に少量であったためである。

ウイルス生活環における U 蛋白質の機能を調べるために、5332 位置での S₆₁I 部位と 8017 位置での B_{am}H1 部位との間の HXBc2 の配列

- 36 -

³⁵S-メチオニンでトランスフェクト後、2、4 及び 7 日目に代謝的に標識された。次いで細胞抽出物を AIDS 患者抗血清で免疫沈降し、12.5% ポリアクリルアミドゲルにかけた。そのゲルのオートラジオグラムを図5Bに示す。ここでレーン1、4及び7はそれぞれトランスフェクション後2、4及び7日目の対照細胞である。レーン2、5及び8はそれぞれ2、4及び7日目の HXBc2 でトランスフェクトされた細胞である。レーン3、6、9はそれぞれ2、4、7日目の B H 10 の組換えプロウイルス・トランスフェクト細胞である。

上記明細書を利用するものであれば、本発明の精神に沿うものである限りいかなる変更を加えてもよく、本明細書に記載の特定の実施例に何反してもよい。本発明は前記の特許請求の範囲の範囲及び 発明 によってのみ限定される。

- 38 -

-566-

特開平 2-138978(11)

4. 図面の簡単な説明

図1Aは、HIV-2のSIV株及びROD株と比較した場合のHIV-1のELI株の中心領域の遺伝子構成を示す。図1BはVPU遺伝子蛋白質配列を直線表示したものである。図1Cは多量産されるVPU遺伝子産物の加水分解を示している。

図2A～Dは、VPU遺伝子産物のin vitro特性を示すラジオグラムである。

図3A～Dは、HIV-1のELI株の3'側半分によりコード化される蛋白質を本質的に発現する細胞系におけるVPU遺伝子産物の固定を示すラジオグラムである。

図4は指令RNAの合成に使用されるプラスミドpEUの模式図である。

図5Aは、VPU遺伝子産物を産生することができないウイルスとそれを作ることができないウイルスとの比較のために作製される置換えプロウィ

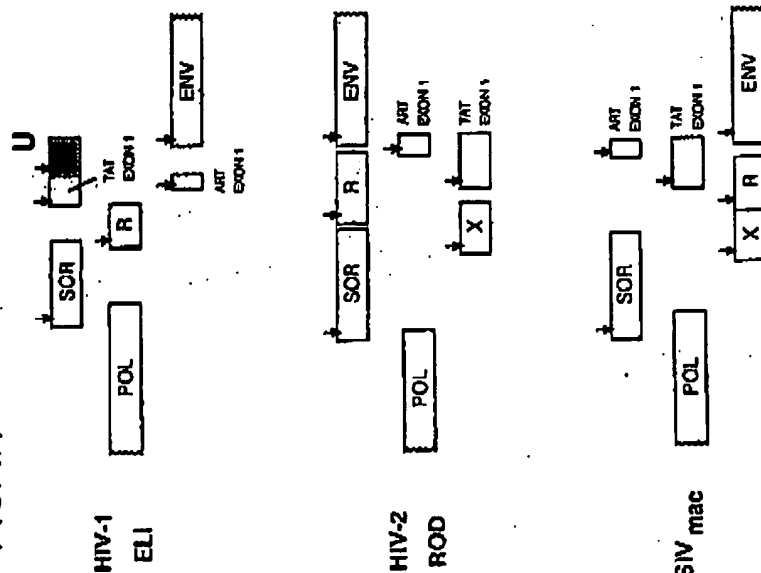
ルスの模式図である。

図5Bは、VPU遺伝子産物を産生可能なプロウィルスプラスミドか又はそれを産生できないプロウィルスプラスミドによるリンパ球のトランスフェクション後に生じるウイルス産物の発生における差を示すオートラジオグラムである。

代理人 弁護士 川口 龍雄
代理人 弁護士 中村 至武
代理人 弁護士 船山 武

図面の浄書 (内容に変更なし)

FIG. 1A



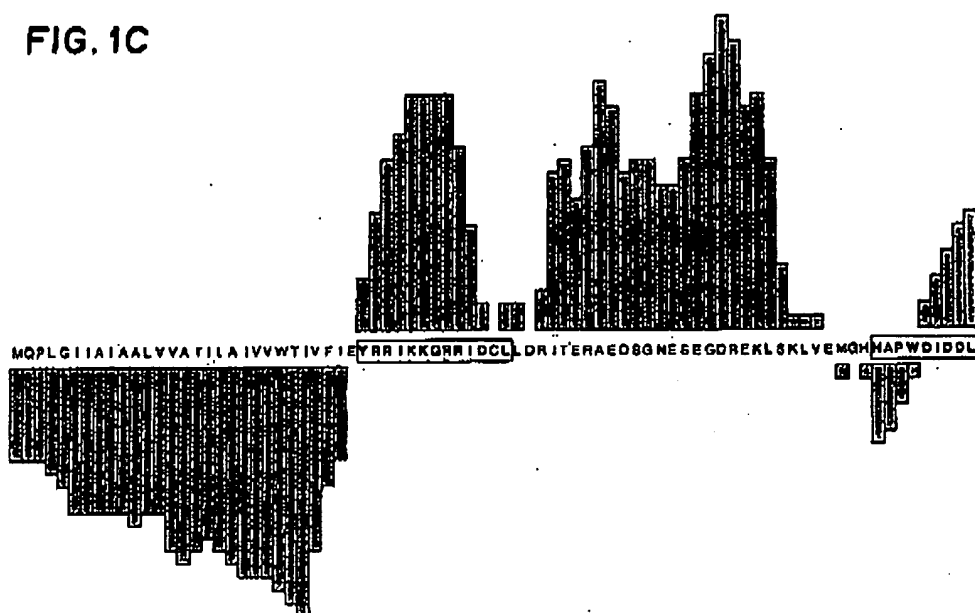
特開平 2-138978(12)

FIG. 1B

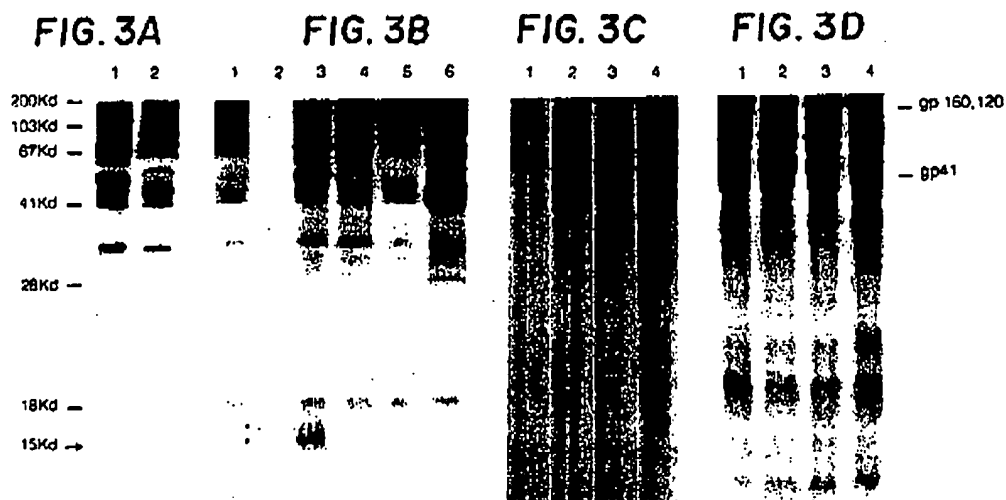
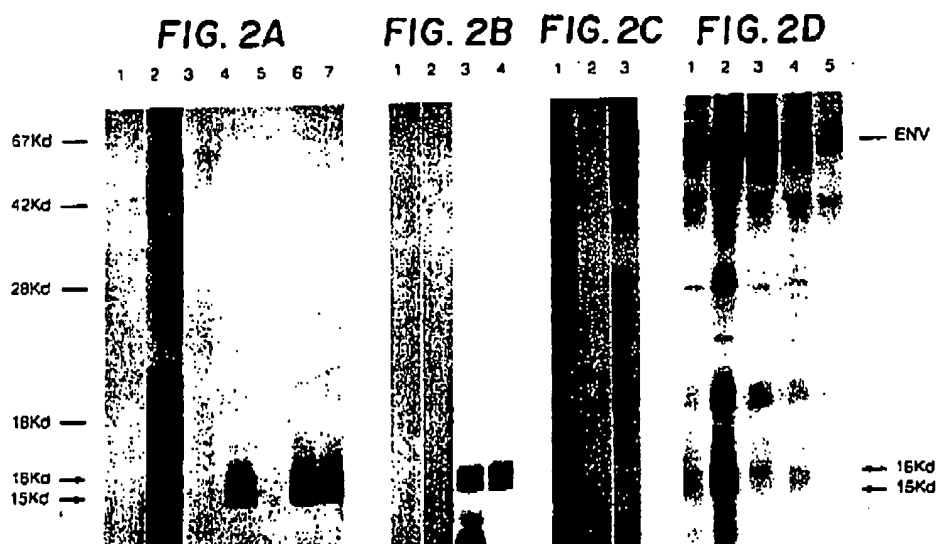
	PEPTIDE #1									
	1	10	11	20	21	30	31	40	41	50
U ELI	MQPLGIIAIA	ALVVAIILAI	VVWTIVFIEY	RRIKKQRRID	CLLDRIERA					
UHXB2	T**IP*V**V	*****I**	***S**I***	*K*LR**K**	R*I**LI***					
UBH10	M**IQ*-**V	*****I**	***K**I***	*K*LR**K**	R*I**LI***					
UBH8	M**IP*VT*V	**A****I**	***K**I***	*K*LR**K**	R*I**LI***					
UHXB3	M**IQ*-**V	*****I**	***K**I***	*K*LR**K**	R*I**LI***					
UMAL	I***V*L**V	****TL*I**	*****I	*K*RR**K**	R*I**IR***					
UBRU	M**IQ*-***	*****I**	***K**I***	*K*LR**K**	R*I**LI***					
USF2	M*S*Q*L**V	S***VA*I**	*****L***	*K*LR**K**	R*I***R*K*					

	PEPTIDE #2									
	51	60	61	70	71	80	81	85		
U ELI	EDSGNESEGD	REKLSKL---	-VEMGHAPW	DIDDL	.	(81)				
UHXB2	*****E	---I*A*VEM	G*****	*V***	.	(82)				
UBH10	*****E	---I*A*VEM	G*****	*V***	.	(81)				
UBH8	*****E	---I*A*VEM	G*****	*V***	.	(82)				
UHXB3	*****E	---I*A*VEM	G*****	*V***	.	(81)				
UMAL	*****E	TEE****---	*****D***	*V***	.	(81)				
UBRU	*****E	---I*A*VEM	G***-*****	*I***	.	(80)				
USF2	*****E	QEEK*A*VEM	G---*L***	*V***	.	(82)				

FIG. 1C



特開平 2-138978(13)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.